



101523075

Rec'd PCT/PTO 25 JAN 2005

PCT/IB 03 / 02 922

21.08.03

*[Handwritten signature]*

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

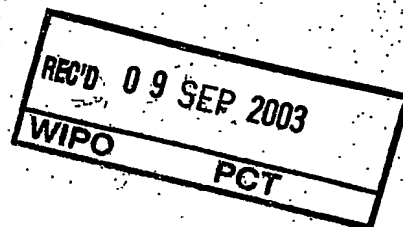
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

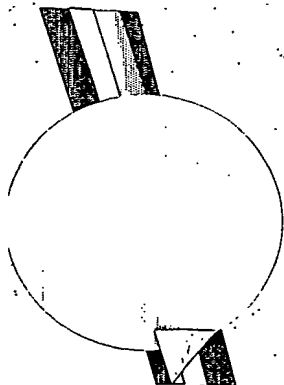
N. TO2002 A 000674



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Inoltre verbale di deposito di Istanza depositato alla Camera di Commercio di Torino n. TOR0514 del 19/09/2002 (pag. 1) Prospetto A (pag. 1); e Testo Descrizione (pagg.33).

Roma, li 14 AGO. 2003



IL DIRIGENTE

*[Handwritten signature of Elena Marinelli]*

Sig.ra E. MARINELLI

**PRIORITY DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**BEST AVAILABLE COPY**

**AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA**

**MODULO A**

**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO**

**A. RICHIEDENTE (I)**

1) Denominazione ROTTA RESEARCH LABORATORIUM S.P.A.  
 Residenza MONZA MI codice 1111 04472830159  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

**B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.**

cognome e nome GIUSEPPE QUINTERNO ed altri \_\_\_\_\_ cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 denominazione studio di appartenenza Jacobacci & Partners S.p.A.  
 via Corso Regio Parco n. 27 città TORINO cap 10152 (prov) TO

**C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario**

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

**D. TITOLO**

classe proposta (sez/cl/act) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

DERIVATI ANTRANILICI AD ATTIVITÀ ANTIGOLEGISTOCHEMINICA  
(ANTI-CCK-1), PROCEDIMENTO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO USO  
FARMACEUTICO.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

**E. INVENTORI DESIGNATI**

cognome nome

cognome nome

1) MAKOVEC FRANCESCO 3) LASSIANI LUCIA  
 2) VARNAVAS ANTONIO 4) ROVATI LUCIO CLAUDIO

**F. PRIORITÀ**

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1) \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_

**G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione**

**H. ANNOTAZIONI SPECIALI**

LETTERA DI INCARICO SEGUE



**DOCUMENTAZIONE ALLEGATA**

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV n. pag. 2/4 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio) (esemplare)  
 Doc. 2) ☒ PROV n. tav. 00 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  
 Doc. 3) ☒ RIS dichiarazione sostitutiva di certificazione  
lettura e incarico, procura e nominativo procura generale  
 Doc. 4) ☒ RIS designazione inventore  
 Doc. 5) ☒ RIS documenti di priorità con traduzione in italiano  
 Doc. 6) ☒ RIS autorizzazione o atto di cessione  
 Doc. 7) ☒ nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire

Duecentonovantuno/80

COMPILATO IL 21/07/2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CONTINUA SINO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

GIUSEPPE QUINTERNO  
 (scr. No. 257BM)

Jacobacci & Partners S.p.A.

C. C. I. A. A. DI TORINO

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

**2002 A000674**

codice 01

L'anno millenovecento Due mila due

il giorno ventisei

del mese di luglio

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

**I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE**

IL DEPOSITANTE

GIUSEPPE QUINTERNO

Timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

Giuseppe Quintero

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

10 2002 A 000674

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

26 / 01 / 2002

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

ROTTA RESEARCH LABORATORIUM S.P.A.

Residenza

MONZA MI

## D. TITOLO

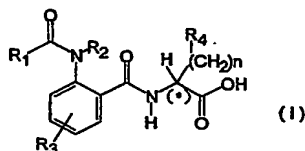
DERIVATI ANTRANILICI AD ATTIVITA' ANTICOLECISTOCININICA  
 (ANTI-CCK-1), PROCEDIMENTO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO USO  
 FARMACEUTICO

Classe proposta (sez./cl./scl.)

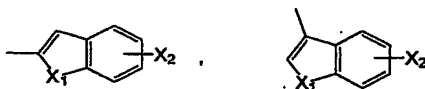
(gruppo/sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

Composti antranilici ad attività anti-CCK di formula generale (I) in cui:



$n$  è un numero intero compreso tra 0 e 7;  $R_1$  è scelto indipendentemente tra i gruppi:



in cui  $X_1$  è scelto indipendentemente tra S, O,  $NR_2$  ed  $X_2$  è un gruppo scelto tra: H,  $C_1$ - $C_4$  alchile, F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ , CN;  $R_2$  è scelto tra H oppure  $CH_3$ ;  $R_3$  è scelto tra H,  $CH_3$ , F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ;  $R_4$  è scelto tra i gruppi: H,  $-S-(CH_2)_m-R_5$ ,  $-SO_2-(CH_2)_m-R_5$  ( $n$  diverso da 0), un gruppo alchilico ramificato, un cicloalchile, un cicloalchenile, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico opzionalmente sostituito;  $R_5$  è scelto tra i gruppi: H, alchile lineare o ramificato, cicloalchile, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico opzionalmente sostituito.

## M. DISEGNO



C.C.I.A.A.  
 TORINO

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

**"DERIVATI ANTRANILICI AD ATTIVITA' ANTICOLECISTOCHININICA  
(ANTI-CCK-1), PROCEDIMENTO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO  
USO FARMACEUTICO"**

di: Rotta Research Laboratorium S.p.A.,  
nazionalità Italiana, San Fruttuoso di Monza,  
Milano

Inventori designati: Francesco Makovec, Antonio Varnavas, Lucia  
Lassiani, Lucio C. Rovati.

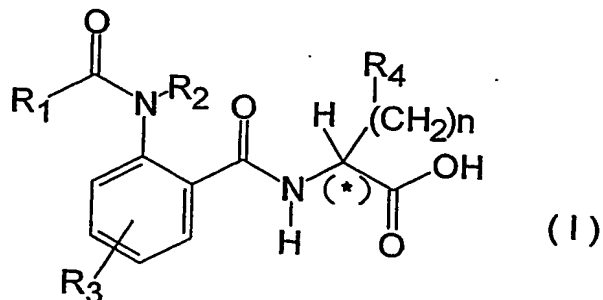
Depositata il: 26 luglio 2002

JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

  
C.Q.M.A.A.  
Torino

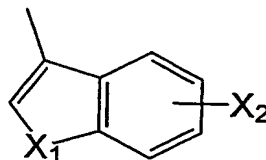
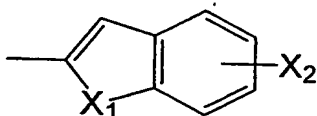
## DESCRIZIONE

La presente invenzione ha per oggetto nuovi derivati dell'acido antranilico che possono essere rappresentati dalla seguente formula generale (I) ed in cui:



$n$  è un numero intero compreso tra 0 e 7;

$R_1$  è scelto indipendentemente tra i gruppi:



JACOBACCI & PARTNERS SpA.

in cui  $X_1$  è scelto indipendentemente tra S, O,  $NR_2$  ed  $X_2$  è un gruppo scelto indipendentemente tra: H,  $C_1$ - $C_4$  alchile lineare o ramificato, F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ , CN;

$R_2$  è scelto indipendentemente tra H oppure  $CH_3$ ;

$R_3$  è scelto indipendentemente tra H,  $CH_3$ , F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ;

$R_4$  è scelto indipendentemente tra i gruppi: H,  $-S-(CH_2)_m-R_5$ ,  $-SO_2-(CH_2)_m-R_5$  ( $n$  diverso da 0) in cui  $m$  è un numero intero compreso tra 0 e 2, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 a 10 atomi di carbonio, un cicloalchenile formato da 4 a 6 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo


alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$ ;

$\text{R}_5$  è scelto tra i gruppi: H, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 fino 10 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CN}$ .

La stereochimica del centro chirale, evidenziato con un asterisco (\*) nella formula (I) può essere R (Rectus), racemica [R (Rectus), S (Sinister)] oppure S (Sinister).

Preferibilmente n è tra 1 e 2;  $\text{R}_1$  è scelto preferibilmente tra i gruppi 2-indolile, 2-indolile sostituito indipendentemente con il gruppo fluoro in posizione 5 oppure con il gruppo metilico in posizione 1;  $\text{R}_3$  è scelto preferibilmente tra i gruppi H,  $\text{CH}_3$ , F, Cl;  $\text{R}_4$  è scelto preferibilmente tra il gruppo fenilico semplice o monosostituito con i gruppi metile, metossi e  $\text{CF}_3$ , mentre la stereochimica dei composti rivendicati sul centro chirale asteriscato nella formula (I) è preferibilmente nella forma racemica (R, S) o R (Rectus).

I composti della presente invenzione dimostrano essere potenti antagonisti per i recettori CCK-1 (CCK-A) della colecistochinina (CCK). Si può pertanto ritenere che essi possano essere impiegati con vantaggio nella terapia di diverse patologie dell'uomo legate a scompensi della CCK o di altri polipeptidi bioattivi ad essa correlati, sia a livello periferico, ossia nel sistema gastrointestinale, sia a livello del sistema nervoso centrale (CNS) o di altri organi ed apparati nei quali tali peptidi bioattivi ricoprono un ruolo fisiologico o patologico. Così ad esempio si può preconizzare un vantaggioso impiego di questi composti per il trattamento, a livello gastrointestinale, di patologie riguardanti la motilità di organi quali cistifellea, stomaco ed intestino. In particolare nel caso di coliche biliari da colecistolitiasi, nel reflusso gastro-esofageo (GERD) dovuto ad un anomalo funzionamento dello sfintere esofageo inferiore (LES) nonché nella sindrome del colon irritabile (IBS).



Altre patologie dell'apparato digerente in cui i composti oggetto possono essere impiegati con vantaggio, strettamente correlate alla funzione secretagogica e a quella trofica che la CCK esplica attraverso i recettori CCK-1, in organi bersaglio dell'apparato gastrointestinale, sono le pancreatiti acute e croniche nonché diversi tumori in cui la CCK o altri peptidi bioattivi correlati ad essa fungono da fattori di crescita. Accanto alle patologie che interessano l'apparato gastrointestinale ci sono molteplici azioni che interessano il CNS ed in cui il sistema CCK-ergico sembra ricoprire un ruolo importante. Anoressia, ansia, panico, depressione, schizofrenia, dolore associato a tumori ecc. sono alcune delle situazioni fisiopatologiche ad ampio impatto sociale nelle quali si ritiene che i composti oggetto dell'invenzione possano essere impiegati con vantaggio.

Fino ad ora sono state descritte numerosi classi chimiche di antagonisti recettoriali della CCK-1. Tra queste segnaliamo derivati benzodiazepinici quali ad esempio la devazepide (L-364,718) (Mol. Pharmacol. 30 (212), 1986) e FK480 (J. Pharmacol. Exp. Ther. 268 (571) (1994), derivati indolici come ad esempio SR 27897 (Eur. J. Pharmacol. 232 (13), 1993) e T-0632 (Eur. J. Pharmacol. 304 (147), 1996), derivati dell'acido glutammico come lorglumide e loxiglumide (Gastrin and Cholecystokinin, Bali and Martinez (Eds.), Elsevier (45), 1987), derivati dell'acido aspartico quali il 2-NAP (Br. J. Pharmacol. 108 (734), 1993), derivati quinazolinonici ad attività mista CCK-1 e CCK-2 antagonista [US Patent 5756502 (1998)].

Tutte queste ricerche dimostrano come vi sia una forte richiesta terapeutica per trovare nuovi farmaci ad attività anti-CCK-1 potenti, selettivi e ben tollerati. Recentemente sono stati descritti dei derivati dell'acido antranilico [TO 95-000554 (1995)] che tuttavia sono dei prodotti antagonisti del sottotipo recettoriale 2 (B) della CCK, mentre non erano fino ad ora noti derivati anti CCK-1 dell'acido antranilico.

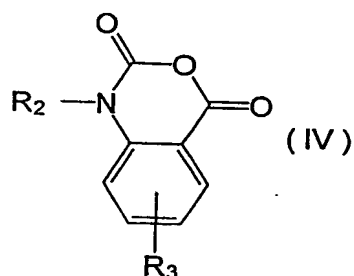
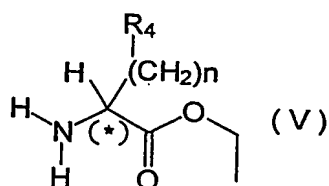
Forme farmaceutiche dei composti oggetto dell'invenzione possono essere preparate secondo tecniche convenzionali come ad esempio compresse, capsule, sospensioni, soluzioni e suppositori, cerotti oppure preparazioni solide per uso orale a rilascio modificato e possono essere somministrate per via orale, parenterale, nasale, rettale e transdermica.

L'ingrediente attivo viene somministrato al paziente tipicamente in ragione da 0.1 a 10 mg/kg di peso corporeo per dose. Per la somministrazione per via

parenterale è preferibile l'impiego di un sale idrosolubile dei composti oggetto come il sale sodico oppure un altro sale non tossico e farmaceuticamente accettabile. Come ingredienti inattivi si possono impiegare sostanze comunemente utilizzate in tecnica farmaceutica come eccipienti quali diluenti, leganti, aromatizzanti, disaggreganti, coloranti, umettanti, edulcoranti, polimeri naturali o di sintesi ecc.

Il metodo utilizzato per la preparazione dei composti oggetto dell'invenzione comprende le seguenti fasi:

- a) Far reagire in rapporto stechiometrico il cloridrato dell'estere etilico di opportuni aminoacidi di formula (V) in cui n ed R<sub>4</sub> hanno il significato precedentemente indicato ed aventi il centro chirale nella configurazione



desiderata, con l'anidride isatoica di formula (IV) opportunamente sostituita con R<sub>2</sub> ed R<sub>3</sub>, in cui R<sub>2</sub> ed R<sub>3</sub> hanno il significato sopra riportato, in presenza di una amina terziaria quale ad esempio trietilamina, in un solvente inerte e ad una temperatura compresa tra i +10° e la temperatura di ebollizione del solvente, per dare gli N-antranoil-aminoacidi etilesteri di formula (III) (vedi Schema 1, I fase).

- b) Far reagire i derivati antranilici di formula (III), in cui n, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ed R<sub>4</sub> hanno il significato riportato sopra, con una quantità equivalente di un cloruro acilico di formula R<sub>1</sub>-COCl, in cui R<sub>1</sub> ha il significato sopra riportato, preferibilmente in piridina ed ad una temperatura compresa tra i 0° ed i +30° e recuperare dalla miscela di reazione gli acil-derivati di formula (II) (vedi Schema 1, II fase).

- c) Idrolizzare gli esteri di formula (II), in cui  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato riportato sopra, in un solvente inerte (quale ad esempio tetraidrofurano), con una soluzione acquosa di una base inorganica forte (come l'idrossido di litio), per un periodo di tempo compreso tra 4 e 48 ore. Dopo evaporazione del solvente si acidifica e si recuperano dalla massa di reazione e con metodi convenzionali i derivati dell'acido antranilico di formula (I) in cui  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato sopra riportato e con il centro chirale nella configurazione desiderata (vedi Schema 1, III fase).

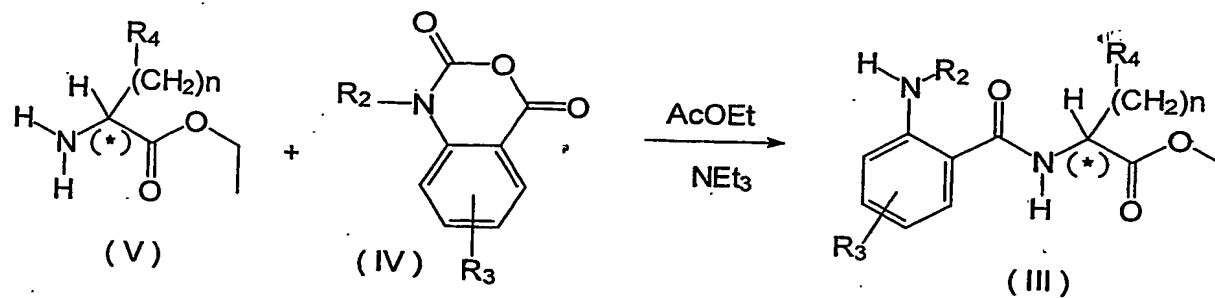
Gli esteri etilici degli aminoacidi di partenza di formula (V), gli aminoacidi da cui derivano nonché le anidridi isatoiche opportunamente sostituite di formula (IV) sono reperibili in commercio o sono stati preparati con metodi convenzionali e descritti in letteratura.

I cloruri acilici di formula  $R_1\text{-COCl}$ , in cui  $R_1$  ha il significato precedentemente indicato, sono stati preparati secondo metodi convenzionali, (preferibilmente impiegando pentacloruro di fosforo), in un solvente inerte, ad una temperatura compresa tra i  $-10^\circ$  ed i  $+20^\circ$  C.

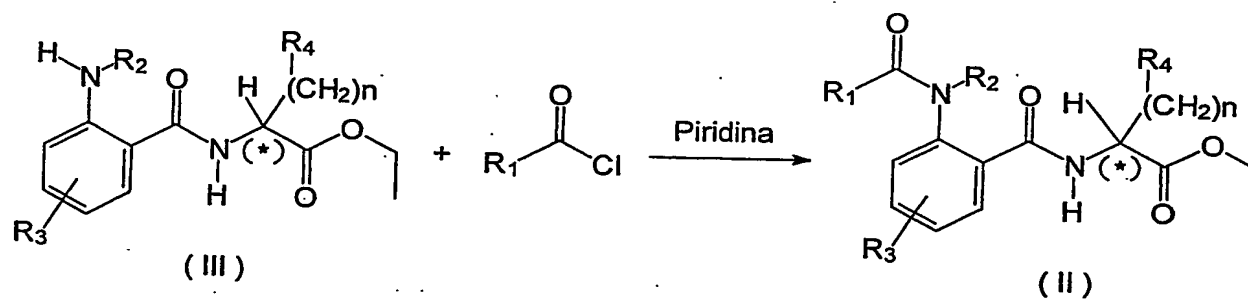
La serie di operazioni del procedimento secondo l'invenzione viene illustrata integralmente nello schema seguente (Schema 1):

# Schema 1

I fase

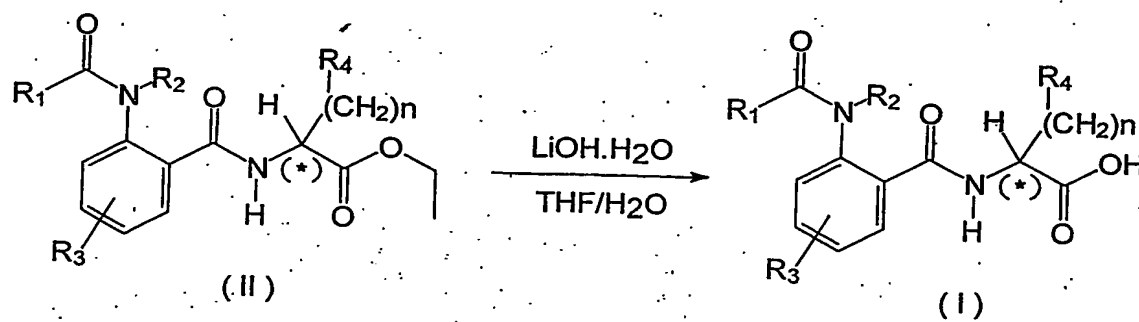


II fase



JACOBACCI & PARTNERS SpA

III fase



I seguenti esempi vengono riportati per meglio illustrare l'invenzione



### Esempio 1

Preparazione di: estere etilico dell'acido 2(R,S)-(2-amino-benzoilamino)-3-fenil-propionico (formula generale III).

A 22.9 g (0.1 moli) del cloridrato della DL-fenilalanina etil estere, sospesi in 500 ml di acetato di etile, si aggiungono 13.9 ml di trietilamina (0.1 moli) e, sotto agitazione, 16.3 g (0.1 moli) di anidride isatoica. Dopo riscaldamento a refluxo per 4 ore la miscela di reazione viene raffreddata a temperatura ambiente e filtrata. Il filtrato viene lavato con NaOH 1N e poi con acqua. La fase organica viene disidratata ed evaporata ed il residuo oleoso è friabilizzato da etere di petrolio 40-60°. Il prodotto grezzo viene cristallizzato da etile acetato / esano 1:1 (v/v). Dopo raffreddamento, il solido bianco formato viene filtrato ed essiccato a 60° C, ottenendo 25.0 g (0.08 moli) di prodotto con resa del 80% ( $C_{18}H_{20}N_2O_3$ ).

P.f. 85°C

TLC (AcOEt/Esano 1:1) - Rf: 0.63.

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.24 (t, 3H,  $-CH_3$ ); 3.21 (m, 2H,  $-CH_2-CH<$ ); 4.18 (q, 2H,  $-CH_2-O-$ ); 4.97 (m, 1H,  $>CH-$ ); 5.45 (s, 2H,  $-NH_2$ ); 6.52 (d, 1H,  $-NH-$ ); 6.61-7.28 (m, 9H, aromatici).

Tutti i composti di formula III vengono sintetizzati impiegando la medesima procedura (vedi schema 1- I fase).

### Esempio 2

Preparazione di: estere etilico dell'acido 2(R,S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico (formula generale II).

Ad una sospensione di 16.1 g (0.1 moli) dell'acido indol-2-carbossilico in 250 ml di diclorometano, a 0°C, vengono aggiunti a piccole porzioni e sotto agitazione 31.2 g (0.15 moli) di pentacloruro di fosforo. Si lascia reagire a temperatura ambiente per 3 ore, si aggiunge diclorometano e si evapora il solvente sotto vuoto. Il cloruro dell'acido così formatosi, sciolto in 50 ml di diclorometano, viene aggiunto sotto agitazione ad una soluzione di 31.2 g (0.1 moli) dell'estere etilico dell'acido 2(R,S)-

(2-amino-benzoilamino)-3-fenil-propionico in 100 ml di piridina a temperatura di 0°C. Al termine dell'aggiunta la massa di reazione viene tenuta a 0°C ancora per un'ora e poi a temperatura ambiente per circa 12 ore. Si aggiungono 250 ml di diclorometano e la fase organica si lava con 400 ml di HCl 1N e poi con NaOH 0.1N ed infine con una soluzione satura di NaCl. Dopo essiccamento, si evapora il solvente ed il prodotto grezzo viene purificato per trattamento con metanolo caldo. Dopo raffreddamento il solido viene filtrato ed essiccato a 60°C in stufa, ottenendo 35.5 g (0.078 moli) di prodotto con resa del 78% ( $C_{27}H_{25}N_3O_4$ ).

P.f. 210-211°C

TLC (AcOEt/Esano 1:1) - Rf: 0.69.

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.17 (t, 3H,  $-CH_3$ ); 3.20 (m, 2H,  $-CH_2-CH<$ ); 4.11 (q, 2H,  $-CH_2-O-$ ); 4.79 (m, 1H,  $-CH<$ ); 6.98 (s, 1H, indolo); 7.06-7.82 (m, 12H, aromatici); 8.64 (d, 1H, aromatico); 9.30 (d, 1H,  $-NH-CH<$ ); 11.95 (s, 1H,  $-NH-$  indolo); 12.15 (s, 1H,  $-NH-$ ).

Tutti i composti di formula II vengono sintetizzati impiegando la medesima procedura (vedi schema 1 – II fase).

### Esempio 3

Preparazione di: Acido 2(R,S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico. [composto 1 (formula generale I) – Tabella 1].

Ad una sospensione di 45.5 g (0.1 moli) dell'estere etilico dell'acido 2(R,S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico in un litro di una miscela  $H_2O/THF$  1:1 vengono aggiunti 4.6 g (0.11 moli) di idrossido di litio idrato e lasciati sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Si procede con l'evaporazione del solvente organico ed il prodotto viene ottenuto per precipitazione a 0°C in seguito ad acidificazione con HCl diluito. Il prodotto grezzo è cristallizzato da metanolo, ottenendo 36.3 g (0.085 moli) con resa del 85% ( $C_{25}H_{21}N_3O_4$ ).

P.f. 268-269°C

TLC (AcOEt/MeOH 2:1) - Rf: 0.61.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.27 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<); 4.79 (m, 1H, >CH-); 6.97 (s, 1H, H indolo); 7.06-7.87 (m, 12H, aromatici); 8.64 (d, 1H, H aromatico); 9.21 (d, 1H, -NH-); 11.93 (s, 1H, -NH- indolo); 12.28 (s, 1H, -NH-).

#### Esempio 4

Preparazione di: Acido 2(R)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenilpropionico.

[composto 2 (formula generale I) – Tabella 1].

Si procede secondo quanto descritto negli esempi 1, 2 e 3, partendo dal cloridrato della D-fenilalanina etil estere.

Resa: 43 % ;

Formula : C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

P.f. 271-272°C;

TLC (AcOEt/MeOH 2:1) - R<sub>f</sub>: 0.61

Potere rotatorio:  $[\alpha]_D^{25} = + 13.6$  (c = 0.59, DMF).

Purezza ottica : e.e [ HPLC chirale] = 98.7 %.

Condizioni analitiche HPLC chirale: Colonna CSP-TE-SP-100 250 mm; diametro interno 4 mm; Detector: UV a 254 nm; Eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O 85/15 (v/v) + 20 mM NH<sub>4</sub>OAc; Flusso: 1.00 ml/min; Temperatura: 23° C; Tempo di ritenzione: 5.6 min contro 4.0 min dell'enantiomero S.

#### Esempio 5

Preparazione di: Acido 2(S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenilpropionico.

[composto 3 (formula generale I) – Tabella 1].

Si procede secondo quanto descritto nell'esempio 4, partendo dal cloridrato della L-fenilalanina etil estere.

Resa: 50 % ;

Formula : C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

P.f. 270-271°C;

TLC (AcOEt/MeOH 2:1) - R<sub>f</sub>: 0.61

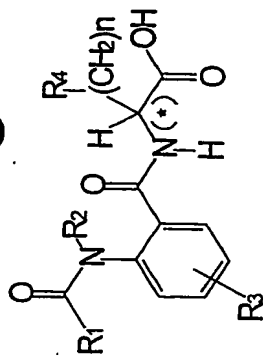
Potere rotatorio:  $[\alpha]_D^{25} = -15.8$  (c = 0.57, DMF);

Purezza ottica : e.e [ HPLC chirale] > 99.5 %.

Condizioni analitiche HPLC chirale: Colonna CSP-TE-SP-100 250 mm; diametro interno 4 mm; Detector: UV a 254 nm; Eluente MeOH/H<sub>2</sub>O : 85/15 (v/v) + 20 mM NH<sub>4</sub>OAc; Flusso: 1.00 ml/min; Temperatura: 23° C; Tempo di ritenzione: 4.0 min contro 5.6 min dell'enantiomero R.

Tutti i composti di formula I vengono sintetizzati impiegando la medesima procedura (vedi schema 1). Nella seguente tabella 1, vengono riportati alcuni dei composti così ottenuti con alcune caratteristiche chimico-fisiche che li identificano ed il solvente di cristallizzazione, senza per questo essi limitino in alcun modo lo spirito e lo scopo dell'invenzione stessa.

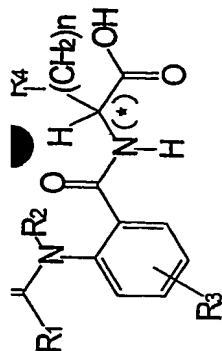
TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)



(I)

COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C)°	TLC (Rf) (Nota 2)
1	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	268-269	0.61*
2	2-Indolyl	H	H	R	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	271-272	0.61*
3	2-Indolyl	H	H	S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	270-271	0.61*
4	2-Indolyl	H	5-chloro	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	268-269	0.59*
5	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 75%	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	186-188	0.50*
6	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	284-286	0.42*
7	6-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	280 dec	0.66*
8	7-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	265 dec	0.66*
9	2-Benzofuryl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	256-257	0.25**
10	2-Benzothienyl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	207-209	0.33**
11	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Methyl-phenyl	MeOH	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	278-279	0.46*
12	2-Indolyl	H	H	R,S	1	4-Methyl-phenyl	MeOH	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	273-274	0.40*
13	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Chloro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	281-282	0.58*
14	2-Indolyl	H	H	R,S	1	3-Chloro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	248-249	0.52**

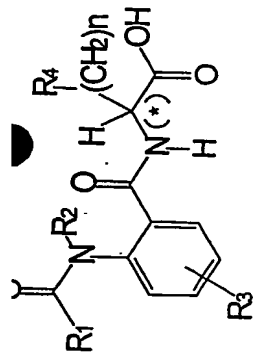




J. TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)

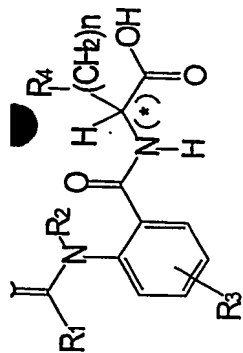
COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C°)	TLC (Rf) (Nota 2)
15	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2,6-dichloro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	287-288	0.53*
16	2-Indolyl	H	H	R,S	1	3-Methoxy-phenyl	MeOH	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	239-240	0.48*
17	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Nitro-phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	253-254	0.41*
18	2-Indolyl	H	H	R,S	1	4-Nitro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	243-244	0.49*
19	2-Indolyl	H	H	R,S	1	4-Fluoro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	263-264	0.54*
20	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	259-260	0.48*
21	2-Indolyl	H	H	R <sup>a</sup>	2	Phenyl	AcOEt	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	267-268	0.48*
22	2-Indolyl	H	H	S <sup>b</sup>	2	Phenyl	AcOEt	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	267-268	0.48*
23	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	2	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	272-274	0.70*
24	2-Indolyl	H	H	R,S	3	Phenyl	MeOH	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	256-257	0.54*
25	2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Methyl-phenyl	EtOH 99%	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	257-258	0.51*
26	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	2	2-Methyl-phenyl	EtOH 96%	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	262-263	0.71*
27	1-Methyl-2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Methyl-phenyl	EtOH 75%	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	158-160	0.65*
28	2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Nitro-phenyl	EtOH 99%	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	263-264	0.44*

(<sup>a</sup>) Enantiomero R [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +35.4° (C=0.65; DMF); (<sup>b</sup>) Enantiomero S [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -34.8° (C=0.65; DMF)



./ TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)

COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C)°	TLC (Rf) (Nota 2)
29	2-Indolyl	H	H	R,S	2	4-Nitro-phenyl	EtOH 99%	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	265 dec	0.43*
30	2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Methoxy-phenyl	EtOH 99%	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	238-239	0.67*
31	2-Indolyl	H	H	R,S	2	3-Methoxy-phenyl	EtOH 99%	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	233-235	0.61*
32	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	2	2-Methoxy-phenyl	EtOH 96%	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	252 dec	0.73*
33	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Phenyl	MeOH	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	265-266	0.34**
34	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Methyl	MeOH	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	274-276	0.34*
35	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	0	Ethyl	MeOH	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	220-221	0.40*
36	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	0	Propyl	MeOH	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	223-224	0.65*
37	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	0	Butyl	MeOH	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	192-193	0.70*
38	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Pentyl	EtOH 96%	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	241-243	0.76*
39	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Hexyl	EtOH 96%	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	258-260	0.56*
40	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Heptyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	242-243	0.64*
41	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Isopropyl	EtOH 99%	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	276-277	0.58*
42	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Isopropyl	MeOH	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	257-259	0.51**



./ TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)

(I)

COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C)°	TLC (Rf) (Nota 2)
43	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Isopropyl	AcOEt	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	252-253	0.73*
44	2-Indolyl	H	H	R,S	3	Isopropyl	AcOEt	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	247-248	0.83*
45	2-Indolyl	H	H	R,S	4	Isopropyl	AcOEt	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	240 dec	0.78*
46	2-Indolyl	H	H	R,S	0	2-Ethyl-butyl	MeOH	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	218-219	0.68*
47	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Ethyl-butyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	217-218	0.77*
48	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Cyclohexyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	222-223	0.58*
49	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Cyclohexyl	EtOH 95%	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	268-269	0.63*
50	2-Indolyl	H	H	R,S	3	Cyclohexyl	AcOEt	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	241-242	0.86*
51	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Methylsulfanyl	MeOH	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	250-251	0.38*
52	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Phenylsulfanyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	252-253	0.56*
53	2-Indolyl	H	H	R,S	1	1-Adamanty/sulfanyl	EtOH 95%	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	261-263	0.49*
54	2-Indolyl	Methyl	H	R,S	1	Phenyl	AcOEt	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	191-193	0.26*
55	3-Indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	223-224	0.40*

Nota 1 Configurazione sul carbonio siglato (\*) nella formula generale (I); Nota 2 \* Eluente, AcOEt / MeOH 2:1 (v/v); \*\* Eluente, AcOEt / MeOH 3:1 (v/v).

## DESCRIZIONE DELL'ATTIVITA' FARMACOLOGICA



### 1. Attività anticollecistochinica (anti CCK-1) in vitro

Per valutare la capacità dei composti oggetto dell'invenzione di interagire con il recettore CCK-1 sono stati eseguiti saggi di binding su acini pancreatici isolati di ratto, impiegando quale ligando marcato la [<sup>125</sup>I]-BH-CCK-8 solfatata, secondo il procedimento descritto da Makovec F. [ J. Med. Chem. 35, (1992), 28]. Gli acini pancreatici ottenuti dalla digestione enzimatica del pancreas di ratti maschi outbred del ceppo Sprague Dawley; vengono incubati in presenza del tracciante radioattivo ed ai composti in studio per 30 minuti a 37°C. Dopo aver scartato il supernatante si è determinata la radioattività associata al pellet con uno scintillatore liquido. Il binding specifico si è determinato come differenza tra il binding in assenza ed in presenza di CCK-8, 1·10<sup>-6</sup> M. I risultati ottenuti sono evidenziati in tabella 2, in cui viene riportata la IC<sub>50</sub>, ossia la concentrazione (espressa in micromoli/litro) dell'antagonista capace di spiazzare per il 50% la [<sup>125</sup>I]-BH-CCK-8 dal recettore. I valori di IC<sub>50</sub> riportati sono stati calcolati con il metodo della regressione su un set di almeno 3 esperienze per ogni composto studiato.

Dai dati riportati in tabella 2 si osserva che molti dei composti oggetto dell'invenzione, come ad esempio i composti 21, 23, 25, 26, 30 e 32 sono dei potenti inibitori del binding della [<sup>125</sup>I]-BH-CCK-8 ai recettori CCK-1 degli acini pancreatici di ratto, esibendo un'affinità a livello nanomolare.

### 2. Attività anticollecistochinica (anti CCK-2) in vitro

Onde verificare l'ipotesi che i composti oggetto dell'invenzione fossero degli antagonisti CCK-1 specifici, si è saggiata per alcuni dei composti più attivi quali CCK-1 antagonisti anche l'eventuale affinità per i recettori centrali della CCK di tipo CCK-2. A tale proposito sono stati eseguiti saggi di binding su cortecce cerebrali di cavia albina maschio outbred del ceppo Hartley, impiegando quale ligando marcato la [<sup>125</sup>I]-BH-CCK-8 solfatata, secondo il procedimento descritto da Makovec F. [ J. Med. Chem. 35, (1992), 28].

**Tabella 2: Inibizione del binding della [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 agli acini pancreatici isolati di ratto.**

Composto	IC <sub>50</sub> (micromoli/litro)	Composto	IC <sub>50</sub> (micromoli/litro)
1	0.24	28	0.12
2	0.11	29	0.12
3	7.13	30	0.008
4	0.41	31	0.01
5	0.17	32	0.009
6	0.06	33	0.26
7	0.16	34	1.96
8	0.09	35	3.08
9	0.52	36	0.21
10	0.78	37	0.17
11	0.16	38	0.01
12	0.37	39	0.02
13	0.27	40	0.24
14	0.28	41	0.20
15	1.41	42	0.06
16	0.24	43	0.08
17	0.16	44	0.04
18	0.43	45	0.14
19	0.18	46	0.03
20	0.014	47	0.02
21	0.009	48	0.02
22	0.19	49	0.04
23	0.007	50	0.17
24	0.09	51	0.04
25	0.007	52	0.62
26	0.009	53	0.03
27	0.03	54	0.11
		55	1.95

L'incubazione delle membrane cerebrali assieme al tracciante radioattivo ed ai composti in studio è stata effettuata su piastre multi-pozzetto per 120 minuti a 25°C. Ogni pozzetto conteneva membrane corrispondenti a circa 0.5 mg di proteine/ml e 25 pM di ligando marcato in un volume totale di 250 microlitri. Il binding specifico si è determinato come differenza tra il binding in assenza ed in presenza di CCK-8,  $1 \cdot 10^{-6}$  M. Al termine dell'incubazione viene eseguita una rapida filtrazione della piastra sotto vuoto e si misura la radioattività dei singoli filtri estratti dai pozzetti con un contatore di  $\gamma$ -emissione. I risultati ottenuti sono evidenziati in tabella 3, in cui vengono riportati i composti saggiati, le  $IC_{50}$  calcolate con il metodo della regressione su un set di almeno 3 esperienze per ogni composto studiato ed un indice ricavato dal rapporto delle affinità ottenute per i due tipi di recettore CCK-2 e CCK-1.

**Tabella 3: Inibizione del binding della [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 alle membrane corticali di cavia.**

Composto	$IC_{50}$ (micromoli/litro)	Rapporto	Composto	$IC_{50}$ (micromoli/litro)	Rapporto
		$\frac{IC_{50} \text{ CCK - 2}}{IC_{50} \text{ CCK - 1 (*)}}$			$\frac{IC_{50} \text{ CCK - 2}}{IC_{50} \text{ CCK - 1 (*)}}$
6	10.6	176.6	31	3.4	340
20	2.22	158.6	32	5.68	631.1
21	3.8	422.2	38	> 30	> 3000
23	10.8	1542.9	39	> 30	> 1500
25	> 30	> 4286	41	27.4	137
26	5.15	572.2	46	2.67	89
30	3.5	437,5	47	14.8	740
			48	1.22	61

Nota (\*): Dati tratti dalla tabella 2.

Dai risultati riportati in tabella 3 emerge che i composti in oggetto legano debolmente il recettore centrale CCK-2 essendo le loro affinità in media comprese per questo recettore dalle 100 alle 1000 volte inferiori rispetto quelle dimostrate per i recettori di tipo CCK-1. Confrontando questi valori di affinità con quelli

ottenuti per i recettori CCK-1 precedentemente riportati in tabella 2 si può affermare che i composti in oggetto sono dei ligandi potenti e specifici per il recettore CCK-1.

Per verificare l'ipotesi che i composti in oggetto fossero degli antagonisti CCK-1 specifici e non degli agonisti si è saggiata per alcuni dei composti più attivi illustrati in tabella 2 l'attività CCK-1 antagonista su un modello funzionale. Come modello sperimentale si è utilizzato la cistifellea di cavia stimolata in vitro da CCK-8 secondo il metodo descritto da Makovec et al. [Arzneim. Forsch. Drug Res. 35 (7), 1048 (1985)]. I risultati così ottenuti sono illustrati nella seguente Tabella 4 in cui vengono riportati i valori di  $IC_{50}$  (moli/litro).

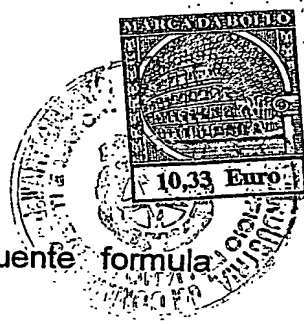
Le  $IC_{50}$  riportate in Tabella 4 rappresentano per ogni composto la media di almeno 2 esperimenti separati, ognuno con un numero di 6-8 concentrazioni.

<b>Tabella 4: Inibizione della contrazione di cistifellea di cavia in vitro indotta da CCK-8 (5 ng/ml)</b>			
<b>Composto</b>	<b><math>IC_{50}</math> (moli/litro)</b>	<b>Composto</b>	<b><math>IC_{50}</math> (moli/litro)</b>
20	$3.5 \times 10^{-8}$	25	$0.8 \times 10^{-8}$
21	$2.0 \times 10^{-8}$	26	$4.3 \times 10^{-8}$
23	$1.5 \times 10^{-8}$	30	$3.0 \times 10^{-8}$

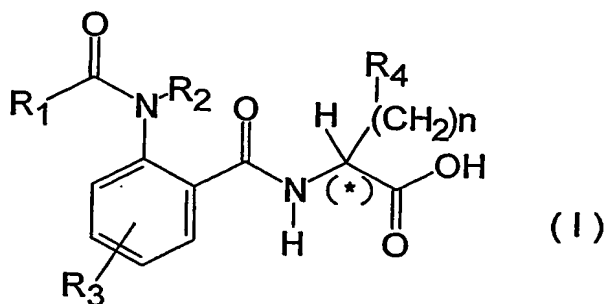
Dai dati riportati in tabella si evince come alcuni dei composti oggetto dell'invenzione sono dotati di una potente attività antagonista verso la CCK anche in un modello funzionale.

Inoltre nessuno dei prodotti testati presentava delle proprietà agoniste apprezzabili fino alla concentrazione massima testata ( $1 \times 10^{-5} M$ ).

## RIVENDICAZIONI

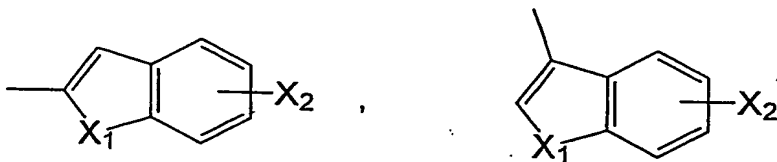


1) Composti che possono essere rappresentati dalla seguente formula generale (I) sotto indicata ed in cui:



$n$  è un numero intero compreso tra 0 e 7;

$R_1$  è scelto indipendentemente tra i gruppi:



in cui  $X_1$  è scelto indipendentemente tra S, O,  $NR_2$  ed  $X_2$  è un gruppo scelto indipendentemente tra: H,  $C_1$ - $C_4$  alchile lineare o ramificato, F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ , CN;

$R_2$  è scelto indipendentemente tra H oppure  $CH_3$ ;

$R_3$  è scelto indipendentemente tra H,  $CH_3$ , F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ;

$R_4$  è scelto indipendentemente tra i gruppi: H,  $-S-(CH_2)_m-R_5$ ,  $-SO_2-(CH_2)_m-R_5$  ( $n$  diverso da 0) in cui  $m$  è un numero intero compreso tra 0 e 2, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 a 10 atomi di carbonio, un cicloalchenile formato da 4 a 6 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo

alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CN;

R<sub>5</sub> è scelto tra i gruppi: H, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 fino 10 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CN.

La stereochemica del centro chirale, evidenziato con un asterisco (\*) nella formula (I) può essere R (Rectus), racemica [R (Rectus), S (Sinister)] oppure S (Sinister).

2) Composti secondo la rivendicazione 1 di formula generale (I), semplici o salificati, in cui R<sub>1</sub> è il gruppo 2-indolil semplice o indipendentemente sostituito in posizione 1 con il gruppo metile ed in posizione 5 con il gruppo fluoro, R<sub>2</sub> ed R<sub>3</sub> sono H, n è 1 oppure 2, R<sub>4</sub> è il gruppo fenile semplice o sostituito con i gruppi metile, fluoro o metossi e la stereochemica del centro chirale asteriscato con (\*) in (I) è R (Rectus), oppure RS (racemo).

3) Preparato farmaceutico comprendente come sostanza attiva almeno uno dei composti secondo la rivendicazione 1 o un loro sale farmaceuticamente accettabile.

4) Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 per l'impiego nella terapia di forme patologiche dell'apparato gastrointestinale quali pancreatiti, coliche biliari, reflusso gastro-esofageo (GERD), sindrome del colon irritabile (IBS), dispepsia non ulcerosa.

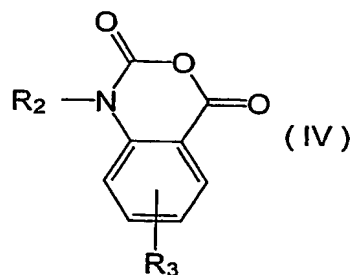
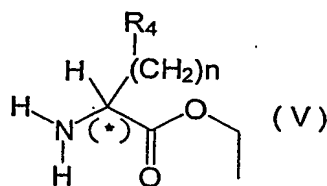
5) Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 per l'impiego nella terapia delle affezioni tumorali sostenute dalla CCK ed altri polipeptidi bioattivi ad essa correlati.

6) Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 per il trattamento di situazioni patologiche del SNC legati a scompensi dei livelli fisiologici neuronali della CCK o di altri polipeptidi bioattivi ad essa correlati, quali ad esempio ansia, attacchi di panico, psicosi, depressione, anoressia etc. o ad altra cause correlate al meccanismo d'azione dei composti secondo la rivendicazione 1.

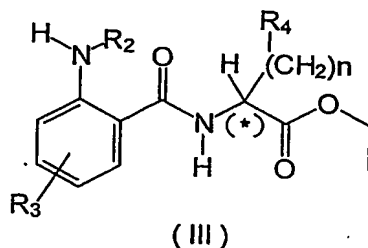
7) Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 comprendente inoltre ingredienti inattivi farmaceuticamente accettabili, scelti dal gruppo che consiste di veicoli, leganti, aromatizzanti, disgreganti, conservanti, umettanti e miscele di questi, o ingredienti che facilitano l'assorbimento transdermico o che permettano il rilascio controllato nel tempo della sostanza attiva.

8) Procedimento per la preparazione di un derivato di formula generale (I) in cui  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  ed  $n$  hanno il significato riportato nella rivendicazione 1 ed in cui i sostituenti sul centro chirale asteriscato con (\*) hanno la configurazione R, S, oppure (R,S) (racemo), che comprende le operazioni di:

a) Far reagire in rapporto stechiometrico il cloridrato dell'estere etilico degli aminoacidi di formula (V) in cui  $n$  ed  $R_4$  hanno il significato sopra indicato ed aventi il centro chirale nella configurazione desiderata, con l'anidride isatoica di formula (IV)

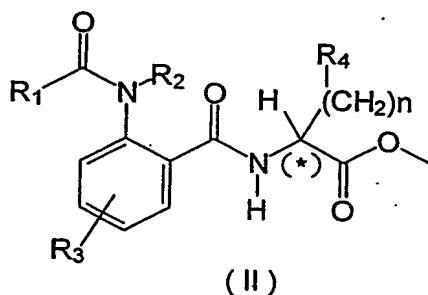


opportunamente sostituita con  $R_2$  ed  $R_3$ , in cui  $R_2$  ed  $R_3$  hanno il significato sopra riportato, in presenza di una amina terziaria quale ad esempio trietilamina, in un solvente inerte e ad una temperatura compresa tra i  $+10^\circ$  e la temperatura di ebollizione del solvente, per dare gli N-antranoil-aminoacidi etilesteri di formula (III).

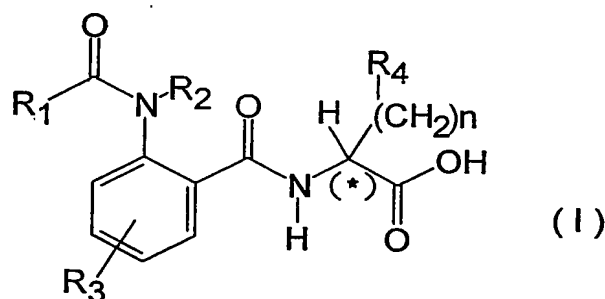


b) Far reagire i derivati antranilici di formula (III), in cui  $n$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato riportato sopra, con una quantità equivalente di un cloruro acilico di formula  $R_1\text{-COCl}$ , in cui  $R_1$  ha il significato sopra riportato, preferibilmente in

piridina ed ad una temperatura compresa tra i 0° ed i +30° e recuperare dalla miscela di reazione gli acil-derivati di formula (II).



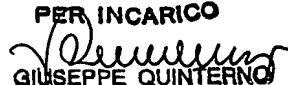
c) Idrolizzare gli esteri di formula (II), in cui n, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ed R<sub>4</sub> hanno il significato riportato sopra, in un solvente inerte (quale ad esempio tetraidrofurano), con una soluzione acquosa di una base inorganica forte (come l'idrossido di litio), per un periodo di tempo compreso tra 4 e 48 ore. Dopo evaporazione del solvente ed acidificazione, recuperare dalla massa di reazione i derivati dell'acido antranilico di formula (I)



in cui n, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ed R<sub>4</sub> hanno il significato sopra riportato e con il centro chirale nella configurazione desiderata.

I composti finali di formula (I) vengono isolati come tali oppure come sali farmaceuticamente accettabili e purificati con metodi convenzionali.

JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

PER INCARICO  
  
 GIUSEPPE QUINTERIO  
 (scr. No. 257BM)

  
 C.C.A.A.A.  
 Torino

C.C.I.A.A. DI TORINO

Verbale di deposito di istanze e documenti concernenti priorità

L'anno Duemiladue il giorno diciannove del mese di settembre

la Ditta/il Signor ROTTA RESEARCH LABORATORIUM S.P.A.

con sede/residente in MONZA MI ITALIA

Rappresentato/a dai Signori Filippo Jacobacci (Iscr. N. 262BM), Guido Jacobacci (Iscr. N. 263BM), Giuseppe Quinterno (Iscr. N. 257BM), Massimo Introvigne (Iscr. N. 368BM), Paolo Rambelli (Iscr. N. 435BM), Angelo Gerbino (Iscr. N. 488BM), Fabio Siniscalco (Iscr. N. 347BM), Claudio Maggioni (Iscr. N. 113BM), Francesco Serra (Iscr. N. 90BM), Corrado Fioravanti (Iscr. N. 553BM), Paolo Ernesto Crippa (Iscr. N. 903BM), Luca Gallo (Iscr. N. 949BM) ed anche, limitatamente alla materia delle registrazioni di marchio, i Signori Enrico Riccardino (Iscr. N. 799M), Patrizia Franceschina (Iscr. N. 787M), Gabriele Borasi (Iscr. N. 684M), Sergio Mulder (Iscr. N. 683M), Silvia Lazzarotto (Iscr. N. 789M), Carlo Alberto Demichelis (Iscr. N. 800M), Franca Acuto (Iscr. N. 783M), Giulio Martellini (Iscr. N. 886M), Sylvain Rousseau (Iscr. N. 984M), Eleonora Guiotto (Iscr. N. 975M), Laura Salustri (Iscr. N. 879M), Fabiola Anna Quintavalle (Iscr. N. 981M), Lucia Vittorangeli (Iscr. N. 983M) nonché, limitatamente alla materia dei brevetti per invenzione e modelli industriali, i Signori Giorgio Long (Iscr. N. 834B), Ilaria Simonelli (Iscr. N. 859B), Edgardo Deambrogi (Iscr. N. 931B), Diego Giugni (Iscr. N. 934B), Ferruccio Postiglione (Iscr. N. 940B) della società Jacobacci & Partners S.p.A., domiciliati presso quest'ultima in TORINO, Corso Regio Parco, 27 - 10152, ed elettivamente domiciliato/a agli effetti di legge anche "ai sensi dell'art. 75, 3° c. del R.D. 29 giugno 1939, N. 1127 e dell'art. 56, 2° c. del 21 giugno 1942, N. 929", presso detti mandatarî al suddetto indirizzo della Jacobacci & Partners S.p.A. in TORINO, Corso Regio Parco, 27 - 10152

a seguito di domanda di Brev. di Invenzione depositata in TORINO in data 26 Luglio 2002

Protocollo n. TO2002A000674

ha depositato presso questo Ufficio i sottoelencati documenti:

1) 2 copie della descrizione definitiva e prospetto A

2)

3)

~~Copia del presente verbale è stata consegnata all'interessato~~

p. Il depositante

DINO CHIALE

L'ufficiale rogante

Mirella CAVALLARI  
CATEGORIA C

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

FUSPETTO A

NUMERO DOMANDA TC2002A000674

REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

26/07/2002

DATA DI RILASCIO

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

ROTTA RESEARCH LABORATORIUM S.P.A.

Residenza

MONZAMI

## D. TITOLO

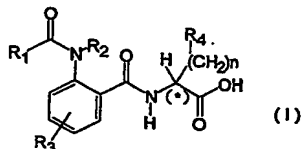
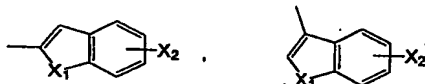
DERIVATI ANTRANILICI AD ATTIVITA' ANTICOLECISTOCININICA(ANTI-CCK-1), PROCEDIMENTO PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO USOFARMACEUTICO

Classe proposta (sez./cl./scel)

(gruppo/sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

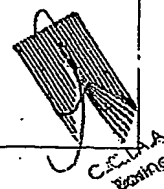
Composti antranilici ad attività anti-CCK di formula generale (I) in cui:

n è un numero intero compreso tra 0 e 7; R<sub>1</sub> è scelto indipendentemente tra i gruppi:

in cui X<sub>1</sub> è scelto indipendentemente tra S, O, NR<sub>2</sub> ed X<sub>2</sub> è un gruppo scelto tra: H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alchile, F, Cl, CF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CN; R<sub>2</sub> è scelto tra H oppure CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> è scelto tra H, CH<sub>3</sub>, F, Cl, CF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> è scelto tra i gruppi: H, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>5</sub>, -SO<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>5</sub> (n diverso da 0), un gruppo alchilico ramificato, un cicloalchile, un cicloalchenile, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico opzionalmente sostituito; R<sub>5</sub> è scelto tra i gruppi: H, alchile lineare o ramificato, cicloalchile, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico opzionalmente sostituito.

## M. DISEGNO

*Luella Cavalleri*



DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:  
 "Derivati antranilici ad attività anticolecistochinica (anti-CCK-1), procedimento per la loro preparazione e loro uso farmaceutico"

Di: ROTTA RESEARCH LABORATORIUM S.p.A., nazionalità italiana, Via Valosa di Sopra, 7/9, 20052 SAN FRUTTUOSO DI MONZA (Milano)

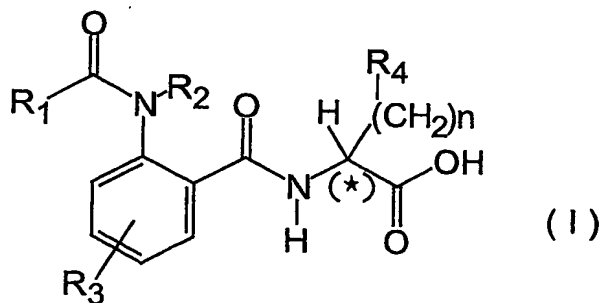
Inventori designati: Francesco MAKOVEC, Antonio VARNAVAS, Lucia LASSIANI, Lucio Claudio ROVATI

Depositata il: 26 luglio 2002

\*\*\*

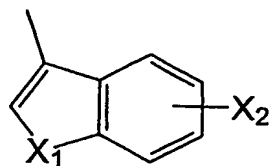
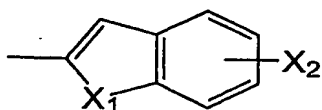
### DESCRIZIONE

La presente invenzione ha per oggetto nuovi derivati dell'acido antranilico che possono essere rappresentati dalla seguente formula generale (I) ed in cui:



n è un numero intero compreso tra 0 e 7;

R<sub>1</sub> è scelto indipendentemente tra i gruppi:



in cui  $X_1$  è scelto indipendentemente tra S, O,  $NR_2$  ed  $X_2$  è un gruppo scelto indipendentemente tra: H,  $C_1$ - $C_4$  alchile lineare o ramificato, F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ , CN;

$R_2$  è scelto indipendentemente tra H oppure  $CH_3$ ;

$R_3$  è scelto indipendentemente tra H,  $CH_3$ , F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ;

$R_4$  è scelto indipendentemente tra i gruppi: H, -S- $(CH_2)_m-R_5$ ,  $-SO_2-(CH_2)_m-R_5$  (n diverso da 0) in cui m è un numero intero compreso tra 0 e 2, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 a 10 atomi di carbonio, un cicloalchenile formato da 4 a 6 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio,  $-NO_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ;

$R_5$  è scelto tra i gruppi: H, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 fino 10 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio,  $-NO_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-CN$ .

La stereochimica del centro chirale, evidenziato con un asterisco (\*) nella formula (I) può essere R (Rectus), racemica [R (Rectus), S (Sinister)] oppure S (Sinister).

Preferibilmente n è tra 1 e 2;  $R_1$  è scelto preferibilmente tra i gruppi 2-indolile, 2-indolile sostituito indipendentemente con il gruppo fluoro in posizione 5 oppure con il gruppo metilico in posizione 1;  $R_3$  è scelto preferibilmente tra i gruppi H,  $CH_3$ , F, Cl;  $R_4$  è scelto preferibilmente tra il gruppo fenilico semplice o monosostituito con i gruppi metile, metossi e  $CF_3$ , mentre la stereochimica dei composti rivendicati sul centro chirale

asteriscato nella formula (I) è preferibilmente nella forma racemica (R, S) o R (Rectus).

I composti della presente invenzione dimostrano essere potenti antagonisti per i recettori CCK-1 (CCK-A) della colecistochinina (CCK). Si può pertanto ritenere che essi possano essere impiegati con vantaggio nella terapia di diverse patologie dell'uomo legate a scompensi della CCK o di altri polipeptidi bioattivi ad essa correlati, sia a livello periferico, ossia nel sistema gastrointestinale, sia a livello del sistema nervoso centrale (CNS) o di altri organi ed apparati nei quali tali peptidi bioattivi ricoprono un ruolo fisiologico o patologico. Così ad esempio si può preconizzare un vantaggioso impiego di questi composti per il trattamento, a livello gastrointestinale, di patologie riguardanti la motilità di organi quali cistifellea, stomaco ed intestino. In particolare nel caso di coliche biliari da colecistolitiasi, nel reflusso gastro-esofageo (GERD) dovuto ad un anomalo funzionamento dello sfintere esofageo inferiore (LES) nonché nella sindrome del colon irritabile (IBS). Altre patologie dell'apparato digerente in cui i composti oggetto possono essere impiegati con vantaggio, strettamente correlate alla funzione secre-



JACOBACCI & PARTNERS SpA

tagoga e a quella trofica che la CCK esplica attraverso i recettori CCK-1 in organi bersaglio dell'apparato gastrointestinale, sono le pancreatiti acute e croniche nonché diversi tumori in cui la CCK o altri peptidi bioattivi correlati ad essa fungono da fattori di crescita. Accanto alle patologie che interessano l'apparato gastrointestinale ci sono molteplici azioni che interessano il CNS ed in cui il sistema CCK-ergico sembra ricoprire un ruolo importante. Anoressia, ansia, panico, depressione, schizofrenia, dolore associato a tumori ecc. sono alcune delle situazioni fisiopatologiche ad ampio impatto sociale nelle quali si ritiene che i composti oggetto dell'invenzione possano essere impiegati con vantaggio.

Fino ad ora sono state descritte numerosi classi chimiche di antagonisti recettoriali della CCK-1. Tra queste segnaliamo derivati benzodiazepinici quali ad esempio la devazepide (L-364,718) (Mol. Pharmacol. 30 (212), 1986) e FK480 (J. Pharmacol. Exp. Ther. 268 (571) (1994), derivati indolici come ad esempio SR 27897 (Eur. J. Pharmacol. 232 (13), 1993) e T-0632 (Eur. J. Pharmacol. 304 (147), 1996), derivati dell'acido glutammico come lorglumide e loxiglumide (Gastrin and Cholecystokinin,

Bali and Martinez (Eds.), Elsevier (45), 1987), derivati dell'acido aspartico quali il 2-NAP (Br. J. Pharmacol. 108 (734), 1993), derivati quinazolinici ad attività mista CCK-1 e CCK-2 antagonista [US Patent 5756502 (1998)].

Tutte queste ricerche dimostrano come vi sia una forte richiesta terapeutica per trovare nuovi farmaci ad attività anti-CCK-1 potenti, selettivi e ben tollerati. Recentemente sono stati descritti dei derivati dell'acido antranilico [TO 95-000554 (1995)] che tuttavia sono dei prodotti antagonisti del sottotipo recettoriale 2 (B) della CCK, mentre non erano fino ad ora noti derivati anti CCK-1 dell'acido antranilico.

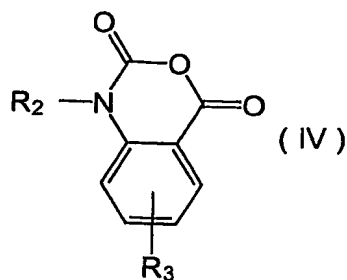
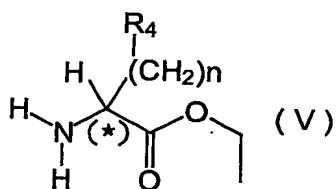
Forme farmaceutiche dei composti oggetto dell'invenzione possono essere preparate secondo tecniche convenzionali come ad esempio compresse, capsule, sospensioni, soluzioni e suppositori, cerotti oppure preparazioni solide per uso orale a rilascio modificato e possono essere somministrate per via orale, parenterale, nasale, rettale e transdermica.

L'ingrediente attivo viene somministrato al paziente tipicamente in ragione da 0.1 a 10 mg/kg di peso corporeo per dose. Per la somministrazione per

via parenterale è preferibile l'impiego di un sale idrosolubile dei composti oggetto come il sale sodico oppure un altro sale non tossico e farmaceuticamente accettabile. Come ingredienti inattivi si possono impiegare sostanze comunemente utilizzate in tecnica farmaceutica come eccipienti quali diluenti, leganti, aromatizzanti, disaggreganti, coloranti, umettanti, edulcoranti, polimeri naturali o di sintesi ecc.

Il metodo utilizzato per la preparazione dei composti oggetto dell'invenzione comprende le seguenti fasi:

- a) Far reagire in rapporto stechiometrico il cloridrato dell'estere etilico di opportuni aminoacidi di formula (V) in cui n ed R<sub>4</sub> hanno il significato precedentemente indicato ed aventi il centro chirale nella configurazione



desiderata, con l'anidride isatoica di formula (IV) opportunamente sostituita con R<sub>2</sub> ed R<sub>3</sub>, in



cui  $R_2$  ed  $R_3$  hanno il significato sopra riportato, in presenza di una amina terziaria quale ad esempio trietilamina, in un solvente inerte e ad una temperatura compresa tra i  $+10^\circ$  e la temperatura di ebollizione del solvente, per dare gli N-antranoil-aminoacidi etilesteri di formula (III) (vedi Schema 1, I fase).

- b) Far reagire i derivati antranilici di formula (III), in cui  $n$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato riportato sopra, con una quantità equivalente di un cloruro acilico di formula  $R_1\text{-COCl}$ , in cui  $R_1$  ha il significato sopra riportato, preferibilmente in piridina ed ad una temperatura compresa tra i  $0^\circ$  ed i  $+30^\circ$  e recuperare dalla miscela di reazione gli acil-derivati di formula (II) (vedi Schema 1, II fase).
- c) Idrolizzare gli esteri di formula (II), in cui  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato riportato sopra, in un solvente inerte (quale ad esempio tetraidrofurano), con una soluzione acquosa di una base inorganica forte (come l'idrossido di litio), per un periodo di tempo compreso tra 4 e 48 ore. Dopo evaporazione del solvente si acidifica e si recuperano dalla massa di reazione e con metodi convenzionali i

derivati dell'acido antranilico di formula (I) in cui  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato sopra riportato e con il centro chirale nella configurazione desiderata (vedi Schema 1, III fase).

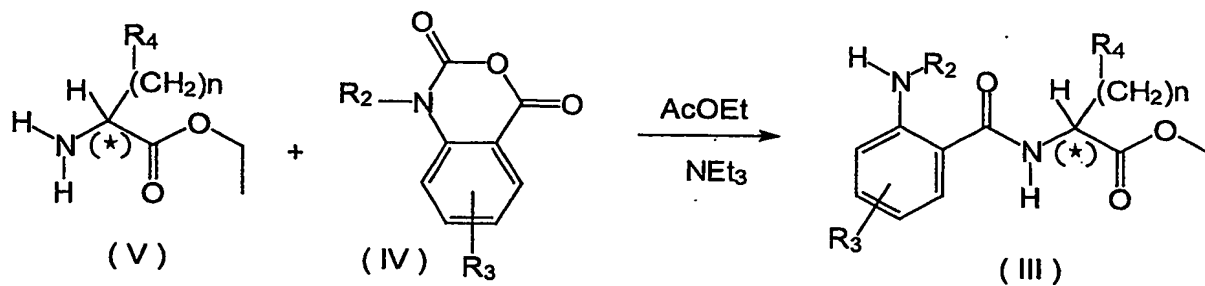
Gli esteri etilici degli aminoacidi di partenza di formula (V), gli aminoacidi da cui derivano nonché le anidridi isatoiche opportunamente sostituite di formula (IV) sono reperibili in commercio o sono stati preparati con metodi convenzionali e descritti in letteratura.

I cloruri acilici di formula  $R_1\text{-COCl}$ , in cui  $R_1$  ha il significato precedentemente indicato, sono stati preparati secondo metodi convenzionali, (preferibilmente impiegando pentacloruro di fosforo), in un solvente inerte, ad una temperatura compresa tra i  $-10^\circ$  ed i  $+20^\circ$  C.

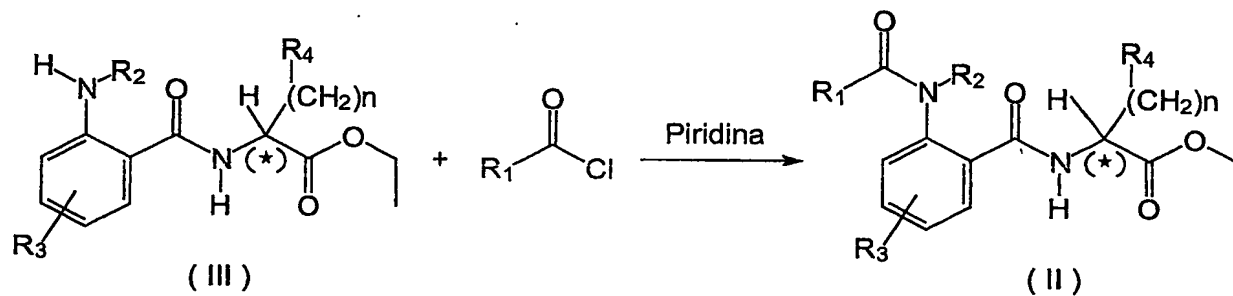
La serie di operazioni del procedimento secondo l'invenzione viene illustrata integralmente nello schema seguente (Schema 1):

Schema 1

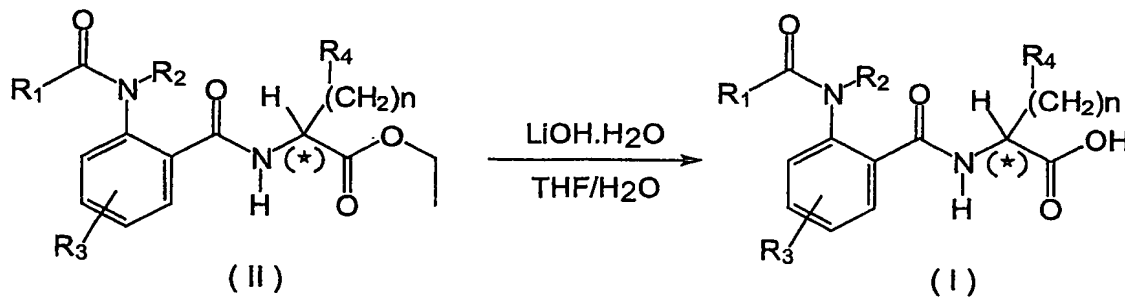
I fase



II fase



III fase



I seguenti esempi vengono riportati per meglio

illustrare l'invenzione.

Esempio 1

Preparazione di: estere etilico dell'acido  
2(R,S)-(2-amino-benzoilamino)-3-fenil-propionico  
(formula generale III).

A 22.9 g (0.1 moli) del cloridrato della DL-fenilalanina etil estere, sospesi in 500 ml di acetato di etile, si aggiungono 13.9 ml di trietilamina (0.1 moli) e, sotto agitazione, 16.3 g (0.1 moli) di anidride isatoica. Dopo riscaldamento a riflusso per 4 ore la miscela di reazione viene raffreddata a temperatura ambiente e filtrata. Il filtrato viene lavato con NaOH 1N e poi con acqua. La fase organica viene disidratata ed evaporata ed il residuo oleoso è friabilizzato da etere di petrolio 40-60°. Il prodotto grezzo viene cristallizzato da etile acetato / esano 1:1 (v/v). Dopo raffreddamento, il solido bianco formato viene filtrato ed essiccato a 60° C, ottenendo 25.0 g (0.08 moli) di prodotto con resa del 80% ( $C_{18}H_{20}N_2O_3$ ).

P.f. 85°C.

TLC (AcOEt/Esano 1:1) - Rf: 0.63.

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  1.24 (t, 3H,  $-CH_3$ ); 3.21 (m, 2H,  $-CH_2-CH<$ ); 4.18 (q, 2H,  $-CH_2-O-$ ); 4.97 (m, 1H,

>CH-); 5.45 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>); 6.52 (d, 1H, -NH-),  
6.61-7.28 (m, 9H, aromatici).



Tutti i composti di formula III vengono sintetizzati impiegando la medesima procedura (vedi schema 1- I fase).

#### Esempio 2

Preparazione di: estere etilico dell'acido 2(R,S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico (formula generale II).

Ad una sospensione di 16.1 g (0.1 moli) dell'acido indol-2-carbossilico in 250 ml di diclorometano, a 0°C, vengono aggiunti a piccole porzioni e sotto agitazione 31.2 g (0.15 moli) di pentacloruro di fosforo. Si lascia reagire a temperatura ambiente per 3 ore, si aggiunge diclorometano e si evapora il solvente sotto vuoto. Il cloruro dell'acido così formatosi, sciolto in 50 ml di diclorometano, viene aggiunto sotto agitazione ad una soluzione di 31.2 g (0.1 moli) dell'estere etilico dell'acido 2(R,S)-(2-amino-benzoilamino)-3-fenil-propionico in 100 ml di piridina a temperatura di 0°C. Al termine dell'aggiunta la massa di reazione viene tenuta a 0°C ancora per un'ora e poi a temperatura ambiente per circa 12 ore. Si aggiungono 250 ml di diclorometano e la fase organica si lava con 400 ml di HCl

JACOBACCI & PARTNERS SpA.

1N e poi con NaOH 0.1N ed infine con una soluzione satura di NaCl. Dopo essiccamento, si evapora il solvente ed il prodotto grezzo viene purificato per trattamento con metanolo caldo. Dopo raffreddamento il solido viene filtrato ed essiccato a 60°C in stufa, ottenendo 35.5 g (0.078 moli) di prodotto con resa del 78% ( $C_{27}H_{25}N_3O_4$ ).

P.f. 210-211°C

TLC (AcOEt/Etano 1:1) - Rf: 0.69.

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.17 (t, 3H,  $-CH_3$ ); 3.20 (m, 2H,  $-CH_2-CH<$ ); 4.11 (q, 2H,  $-CH_2-O-$ ); 4.79 (m, 1H,  $-CH<$ ); 6.98 (s, 1H, indolo); 7.06-7.82 (m, 12H, aromatici); 8.64 (d, 1H, aromatico); 9.30 (d, 1H,  $-NH-CH<$ ); 11.95 (s, 1H,  $-NH-$  indolo); 12.15 (s, 1H,  $-NH-$ ).

Tutti i composti di formula II vengono sintetizzati impiegando la medesima procedura (vedi schema 1 - II fase).

### Esempio 3

Preparazione di: Acido 2(R,S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico.

[composto 1 (formula generale I) - Tabella 1].

Ad una sospensione di 45.5 g (0.1 moli) dell'estere etilico dell'acido 2(R,S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propio-

nico in un litro di una miscela  $H_2O/THF$  1:1 vengono aggiunti 4.6 g (0.11 moli) di idrossido di litio idrato e lasciati sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Si procede con l'evaporazione del solvente organico ed il prodotto viene ottenuto per precipitazione a  $0^\circ C$  in seguito ad acidificazione con  $HCl$  diluito. Il prodotto grezzo è cristallizzato da metanolo, ottenendo 36.3 g (0.085 moli) con resa del 85% ( $C_{25}H_{21}N_3O_4$ ).

P.f.  $268-269^\circ C$

TLC ( $AcOEt/MeOH$  2:1) -  $R_f$ : 0.61.

$^1H$ -NMR ( $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  3.27 (m, 2H,  $-CH_2-CH<$ ); 4.79 (m, 1H,  $>CH-$ ); 6.97 (s, 1H, H indolo); 7.06-7.87 (m, 12H, aromatici); 8.64 (d, 1H, H aromatico); 9.21 (d, 1H,  $-NH-$ ); 11.93 (s, 1H,  $-NH-$  indolo); 12.28 (s, 1H,  $-NH-$ ).

#### Esempio 4

Preparazione di: Acido 2(R)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico. [composto 2 (formula generale I) - Tabella 1].

Si procede secondo quanto descritto negli esempi 1, 2 e 3, partendo dal cloridrato della D-fenilalanina etil estere.

Resa: 43%;

Formula :  $C_{25}H_{21}N_3O_4$ .

P.f. 271-272°C;

TLC (AcOEt/MeOH 2:1) - Rf: 0.61

Potere rotatorio:  $[\alpha]_D^{25} = + 13.6$  (c = 0.59, DMF).

Purezza ottica : e.e [ HPLC chirale ] = 98.7%.

Condizioni analitiche HPLC chirale: Colonna CSP-TE-SP-100 250 mm; diametro interno 4 mm; Detector: UV a 254 nm; Eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O 85/15 (v/v) + 20 mM NH<sub>4</sub>OAc; Flusso: 1.00 ml/min; Temperatura: 23°C; Tempo di ritenzione: 5.6 min contro 4.0 min dell'enantiomero S.

#### Esempio 5

Preparazione di: Acido 2(S)-{2-[(1H-indol-2-carbonil)amino]-benzoilamino}-3-fenil-propionico.  
[composto 3 (formula generale I) - Tabella 1].

Si procede secondo quanto descritto nell'esempio 4, partendo dal cloridrato della L-fenilalanina etil estere.

Resa: 50%;

Formula :  $C_{25}H_{21}N_3O_4$ .

P.f. 270-271°C;

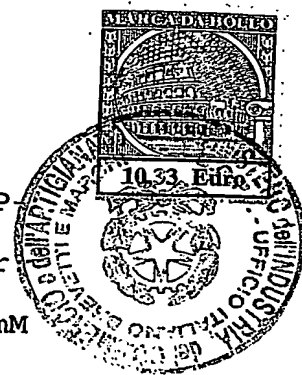
TLC (AcOEt/MeOH 2:1) - Rf: 0.61

Potere rotatorio:  $[\alpha]_D^{25} = - 15.8$  (c = 0.57, DMF);

Purezza ottica : e.e [ HPLC chirale ] > 99.5%.

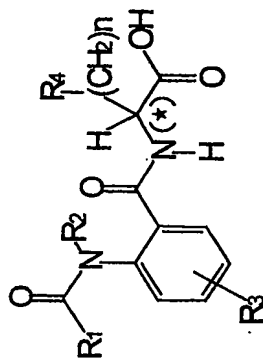
Condizioni analitiche HPLC chirale: Colonna CSP  
TE-SP-100 250 mm; diametro interno 4 mm; Detector  
UV a 254 nm; Eluente MeOH/H<sub>2</sub>O : 85/15 (v/v) + 20 mM  
NH<sub>4</sub>OAc; Flusso: 1.00 ml/min; Temperatura: 23°C; Tem-  
po di ritenzione: 4.0 min contro 5.6 min dell'enan-  
tiomero R.

Tutti i composti di formula I vengono sintetiz-  
zati impiegando la medesima procedura (vedi schema  
1). Nella seguente tabella 1, vengono riportati al-  
cuni dei composti così ottenuti con alcune caratte-  
ristiche chimico-fisiche che li identificano ed il  
solvente di cristallizzazione, senza per questo es-  
si limitino in alcun modo lo spirito e lo scopo  
dell'invenzione stessa.



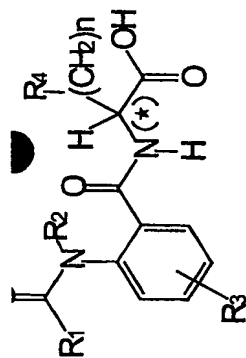
JACOBACCI & PARTNERS SpA

TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)



(I)

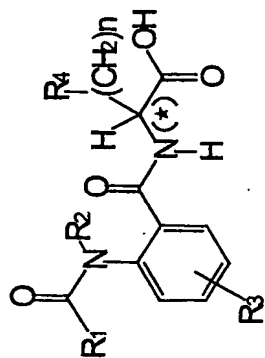
COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C)°	TLC (Rf) (Nota 2)
1	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	268-269	0.61*
2	2-Indolyl	H	H	R	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	271-272	0.61*
3	2-Indolyl	H	H	S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	270-271	0.61*
4	2-Indolyl	H	5-chloro	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	268-269	0.59*
5	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 75%	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	186-188	0.50*
6	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	284-286	0.42*
7	6-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	280 dec	0.66*
8	7-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	265 dec	0.66*
9	2-Benzofuryl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	256-257	0.25**
10	2-Benzothienyl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	207-209	0.33**
11	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Methyl-phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	278-279	0.46*
12	2-Indolyl	H	H	R,S	1	4-Methyl-phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	273-274	0.40*
13	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Chloro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	281-282	0.58*
14	2-Indolyl	H	H	R,S	1	3-Chloro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	248-249	0.52*



./ TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)

COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIO- NE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C)°	TLC (Rf) (Nota 2)
15	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2,6-dichloro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	287-288	0.53*
16	2-Indolyl	H	H	R,S	1	3-Methoxy-phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	239-240	0.48*
17	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Nitro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	253-254	0.41*
18	2-Indolyl	H	H	R,S	1	4-Nitro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	243-244	0.49*
19	2-Indolyl	H	H	R,S	1	4-Fluoro-phenyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	263-264	0.54*
20	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Phenyl	MeOH	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	259-260	0.48*
21	2-Indolyl	H	H	R <sup>a</sup>	2	Phenyl	AcOEt	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	267-268	0.48*
22	2-Indolyl	H	H	S <sup>b</sup>	2	Phenyl	AcOEt	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	267-268	0.48*
23	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	2	Phenyl	EtOH 99%	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	272-274	0.70*
24	2-Indolyl	H	H	R,S	3	Phenyl	MeOH	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	256-257	0.54*
25	2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Methyl-phenyl	EtOH 99%	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	257-258	0.51*
26	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	2	2-Methyl-phenyl	EtOH 96%	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	262-263	0.71*
27	1-Methyl-2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Methyl-phenyl	EtOH 75%	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	158-160	0.65*
28	2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Nitro-phenyl	EtOH 99%	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	263-264	0.44*

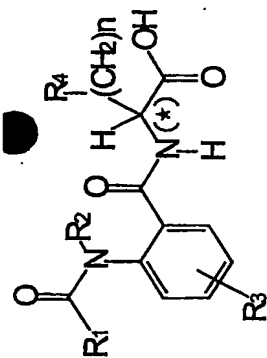
(<sup>a</sup>) Enantiomero R [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +35.4° (C=0.65; DMF); (<sup>b</sup>) Enantiomero S [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -34.8° (C=0.65; DMF)



(I)

./ TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)

COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C°)	TLC (Rf) (Nota 2)
29	2-Indolyl	H	H	R,S	2	4-Nitro-phenyl	EtOH 99%	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	265 dec	0.43*
30	2-Indolyl	H	H	R,S	2	2-Methoxy-phenyl	EtOH 99%	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	238-239	0.67*
31	2-Indolyl	H	H	R,S	2	3-Methoxy-phenyl	EtOH 99%	C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	233-235	0.61*
32	5-Fluoro-2-indolyl	H	H	R,S	2	2-Methoxy-phenyl	EtOH 96%	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	252 dec	0.73*
33	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Phenyl	MeOH	C <sub>24</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	265-266	0.34**
34	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Methyl	MeOH	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	274-276	0.34*
35	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	0	Ethyl	MeOH	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	220-221	0.40*
36	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	0	Propyl	MeOH	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	223-224	0.65*
37	1-Methyl-2-indolyl	H	H	R,S	0	Butyl	MeOH	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	192-193	0.70*
38	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Pentyl	EtOH 96%	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	241-243	0.76*
39	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Hexyl	EtOH 96%	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	258-260	0.56*
40	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Heptyl	MeOH	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	242-243	0.64*
41	2-Indolyl	H	H	R,S	0	Isopropyl	EtOH 99%	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	276-277	0.58*
42	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Isopropyl	MeOH	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	257-259	0.51**



J. TABELLA 1 : COMPOSTI DI FORMULA GENERALE (I)

(I)

COMPOSTO	R1	R2	R3	STEREO (Nota 1)	n	R4	SOLVENTE DI CRISTALLIZZAZIONE	FORMULA	P.TO FUSIONE (C°)	TLC (Rf) (Nota 2)
43	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Isopropyl	AcOEt	$C_{23}H_{25}N_3O_4$	252-253	0.73*
44	2-Indolyl	H	H	R,S	3	Isopropyl	AcOEt	$C_{24}H_{27}N_3O_4$	247-248	0.83*
45	2-Indolyl	H	H	R,S	4	Isopropyl	AcOEt	$C_{25}H_{29}N_3O_4$	240 dec	0.78*
46	2-Indolyl	H	H	R,S	0	2-Ethyl-butyl	MeOH	$C_{24}H_{27}N_3O_4$	218-219	0.68*
47	2-Indolyl	H	H	R,S	1	2-Ethyl-butyl	EtOH 99%	$C_{25}H_{29}N_3O_4$	217-218	0.77*
48	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Cyclohexyl	MeOH	$C_{25}H_{27}N_3O_4$	222-223	0.58*
49	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Cyclohexyl	EtOH 95%	$C_{26}H_{29}N_3O_4$	268-269	0.63*
50	2-Indolyl	H	H	R,S	3	Cyclohexyl	AcOEt	$C_{27}H_{31}N_3O_4$	241-242	0.86*
51	2-Indolyl	H	H	R,S	2	Methylsulfanyl	MeOH	$C_{21}H_{21}N_3O_4S$	250-251	0.38*
52	2-Indolyl	H	H	R,S	1	Phenylsulfanyl	MeOH	$C_{25}H_{21}N_3O_4S$	252-253	0.56*
53	2-Indolyl	H	H	R,S	1	1-Adamantylsulfanyl	EtOH 95%	$C_{29}H_{31}N_3O_4S$	261-263	0.49*
54	2-Indolyl	Methyl	H	R,S	1	Phenyl	AcOEt	$C_{26}H_{23}N_3O_4S$	191-193	0.26*
55	3-Indolyl	H	H	R,S	1	Phenyl	MeOH	$C_{25}H_{21}N_3O_4$	223-224	0.40*

Nota 1 Configurazione sul carbonio siglato (\*) nella formula generale (I); Nota 2 \* Eluente, AcOEt / MeOH 2:1 (v/v); \*\* Eluente, AcOEt / MeOH 3:1 (v/v).



## DESCRIZIONE DELL'ATTIVITA' FARMACOLOGICA

### 1. Attività anticolecistochininica (anti CCK-1) in vitro

Per valutare la capacità dei composti oggetto dell'invenzione di interagire con il recettore CCK-1 sono stati eseguiti saggi di binding su acini pancreatici isolati di ratto, impiegando quale ligando marcato la [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 solfatata, secondo il procedimento descritto da Makovec F. [ J. Med. Chem. 35, (1992), 28]. Gli acini pancreatici ottenuti dalla digestione enzimatica del pancreas di ratti maschi outbred del ceppo Sprague Dawley, vengono incubati in presenza del tracciante radioattivo ed ai composti in studio per 30 minuti a 37°C. Dopo aver scartato il supernatante si è determinata la radioattività associata al pellet con uno scintillatore liquido. Il binding specifico si è determinato come differenza tra il binding in assenza ed in presenza di CCK-8,  $1 \cdot 10^{-6}$  M. I risultati ottenuti sono evidenziati in tabella 2, in cui viene riportata la IC<sub>50</sub>, ossia la concentrazione (espressa in micromoli/litro) dell'antagonista capace di spiazzare per il 50% la [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 dal recettore. I valori di IC<sub>50</sub> riportati sono stati calcolati con il metodo della regressione su un set di almeno 3

esperienze per ogni composto studiato.

Dai dati riportati in tabella 2 si osserva che molti dei composti oggetto dell'invenzione, come ad esempio i composti 21, 23, 25, 26, 30 e 32 sono dei potenti inibitori del binding della [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 ai recettori CCK-1 degli acini pancreatici di ratto, esibendo un'affinità a livello nanomolare.

## **2. Attività anticolecistochinica (anti CCK-2) in vitro**

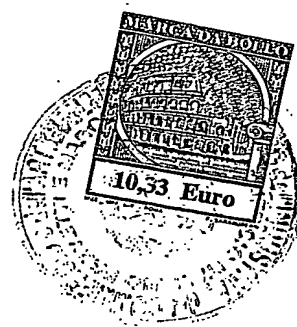
Onde verificare l'ipotesi che i composti oggetto dell'invenzione fossero degli antagonisti CCK-1 specifici, si è saggiata per alcuni dei composti più attivi quali CCK-1 antagonisti anche l'eventuale affinità per i recettori centrali della CCK di tipo CCK-2. A tale proposito sono stati eseguiti saggi di binding su cortecce cerebrali di cavia albina maschio outbred del ceppo Hartley, impiegando quale ligando marcato la [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 solfatata, secondo il procedimento descritto da Makovec F. [J. Med. Chem. 35, (1992), 28].

Tabella 2: Inibizione del binding della [ $^{125}$ I]-BH-CCK-8 agli acini pancreatici isolati di ratto.

Composto	IC <sub>50</sub>	Composto	IC <sub>50</sub>
1	0.24	28	0.12
2	0.11	29	0.12
3	7.13	30	0.008
4	0.41	31	0.01
5	0.17	32	0.009
6	0.06	33	0.26
7	0.16	34	1.96
8	0.09	35	3.08
9	0.52	36	0.21
10	0.78	37	0.17
11	0.16	38	0.01
12	0.37	39	0.02
13	0.27	40	0.24
14	0.28	41	0.20
15	1.41	42	0.06
16	0.24	43	0.08
17	0.16	44	0.04
18	0.43	45	0.14
19	0.18	46	0.03
20	0.014	47	0.02
21	0.009	48	0.02
22	0.19	49	0.04
23	0.007	50	0.17
24	0.09	51	0.04
25	0.007	52	0.62
26	0.009	53	0.03
27	0.03	54	0.11
		55	1.95

JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

L'incubazione delle membrane cerebrali assieme al tracciante radioattivo ed ai composti in studio è stata effettuata su piastre multi-pozzetto per 120 minuti a 25°C. Ogni pozzetto conteneva membrane corrispondenti a circa 0.5 mg di proteine/ml e 25 pM di ligando marcato in un volume totale di 250 microlitri. Il binding specifico si è determinato come differenza tra il binding in assenza ed in presenza di CCK-8,  $1 \cdot 10^{-6}$  M. Al termine dell'incubazione viene eseguita una rapida filtrazione della piastra sotto vuoto e si misura la radioattività dei singoli filtri estratti dai pozzetti con un contatore di  $\gamma$ -emissione. I risultati ottenuti sono evidenziati in tabella 3, in cui vengono riportati i composti saggiati, le  $IC_{50}$  calcolate con il metodo della regressione su un set di almeno 3 esperienze per ogni composto studiato ed un indice ricavato dal rapporto delle affinità ottenute per i due tipi di recettore CCK-2 e CCK-1.



**Tabella 3: Inibizione del binding della [<sup>125</sup>I]-BH-CCK-8 alle membrane corticali di cavia.**

Composto	IC <sub>50</sub> (micromoli/litro)	Rapporto $\frac{IC_{50} \text{ CCK-2}}{IC_{50} \text{ CCK-1(*)}}$	Composto	IC <sub>50</sub> (micromoli/litro)	Rapporto $\frac{IC_{50} \text{ CCK-2}}{IC_{50} \text{ CCK-1(*)}}$
6	10.6	176.6	31	3.4	340
20	2.22	158.6	32	5.68	631.1
21	3.8	422.2	38	> 30	> 3000
23	10.8	1542.9	39	> 30	> 1500
25	> 30	> 4286	41	27.4	137
26	5.15	572.2	46	2.67	89
30	3.5	437,5	47	14.8	740
			48	1.22	61

Nota (\*): Dati tratti dalla tabella 2.

Dai risultati riportati in tabella 3 emerge che i composti in oggetto legano debolmente il recettore centrale CCK-2 essendo le loro affinità in media comprese per questo recettore dalle 100 alle 1000 volte inferiori rispetto quelle dimostrate per i recettori di tipo CCK-1. Confrontando questi valori di affinità con quelli ottenuti per i recettori CCK-1 precedentemente riportati in tabella 2 si può affermare che i composti in oggetto sono dei ligandi potenti e specifici per il recettore CCK-1.

Per verificare l'ipotesi che i composti in oggetto fossero degli antagonisti CCK-1 specifici e non degli agonisti si è saggiata per alcuni dei composti più attivi illustrati in tabella 2 l'atti-

vità CCK-1 antagonista su un modello funzionale. Come modello sperimentale si è utilizzato la cistifellea di cavia stimolata in vitro da CCK-8 secondo il metodo descritto da Makovec et al. [Arzneim. Forsch. Drug Res. 35 (7), 1048 (1985)]. I risultati così ottenuti sono illustrati nella seguente Tabella 4 in cui vengono riportati i valori di  $IC_{50}$  (moli/litro).

Le  $IC_{50}$  riportate in Tabella 4 rappresentano per ogni composto la media di almeno 2 esperimenti separati, ognuno con un numero di 6-8 concentrazioni.

**Tabella 4: Inibizione della contrazione di cistifellea di cavia in vitro indotta da CCK-8 (5 ng/ml)**

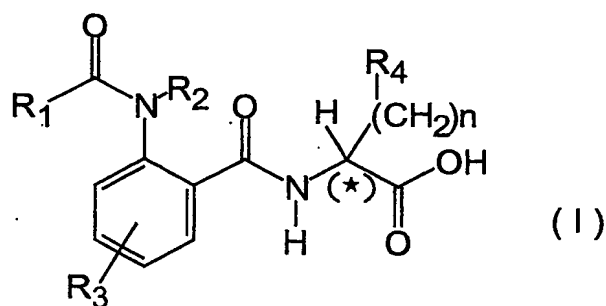
Composto	$IC_{50}$ (moli/litro)	Composto	$IC_{50}$ (moli/litro)
20	$3.5 \times 10^{-8}$	25	$0.8 \times 10^{-8}$
21	$2.0 \times 10^{-8}$	26	$4.3 \times 10^{-8}$
23	$1.5 \times 10^{-8}$	30	$3.0 \times 10^{-8}$

Dai dati riportati in tabella si evince come alcuni dei composti oggetto dell'invenzione sono dotati di una potente attività antagonista verso la CCK anche in un modello funzionale.

Inoltre nessuno dei prodotti testati presentava delle proprietà agoniste apprezzabili fino alla concentrazione massima testata ( $1 \times 10^{-5} M$ ).

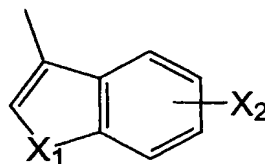
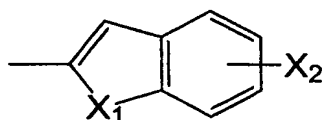
# RIVENDICAZIONI

1. Composti che possono essere rappresentati dalla seguente formula generale (I) sotto indicata ed in cui:



$n$  è un numero intero compreso tra 0 e 7;

$R_1$  è scelto indipendentemente tra i gruppi:



in cui  $X_1$  è scelto indipendentemente tra S, O,  $NR_2$  ed  $X_2$  è un gruppo scelto indipendentemente tra: H,  $C_1$ - $C_4$  alchile lineare o ramificato, F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ , CN;

$R_2$  è scelto indipendentemente tra H oppure  $CH_3$ ;

$R_3$  è scelto indipendentemente tra H,  $CH_3$ , F, Cl,  $CF_3$ ,  $OCH_3$ ;

$R_4$  è scelto indipendentemente tra i gruppi: H, -S-

$(CH_2)_m-R_5$ ,  $-SO_2-(CH_2)_m-R_5$  ( $n$  diverso da 0) in cui  $m$  è un numero intero compreso tra 0 e 2, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 a 10 atomi di carbonio, un cicloalchenile formato da 4 a 6 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio,  $-NO_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ;

$R_5$  è scelto tra i gruppi: H, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un cicloalchile formato da 3 fino 10 atomi di carbonio, il gruppo 1 o 2-adamantilico, un gruppo fenilico semplice oppure mono o bi-sostituito, in cui i sostituenti possono essere scelti indipendentemente tra alogeni, un gruppo alchilico lineare formato da 1 a 3 atomi di carbonio, un gruppo alchilico ramificato formato da 3 a 6 atomi di carbonio, un gruppo alcossilico formato da 1 a 3 atomi di carbonio,  $-NO_2$ ,  $-CF_3$ ,  $-CN$ . La ste-



reochimica del centro chirale, evidenziato con un asterisco (\*) nella formula (I) può essere R (Rectus), racemica [R (Rectus), S (Sinister)] oppure S (Sinister).

2. Composti secondo la rivendicazione 1 di formula generale (I), semplici o salificati, in cui  $R_1$  è il gruppo 2-indolil semplice o indipendentemente sostituito in posizione 1 con il gruppo metile ed in posizione 5 con il gruppo fluoro,  $R_2$  ed  $R_3$  sono H,  $n$  è 1 oppure 2,  $R_4$  è il gruppo fenile semplice o sostituito con i gruppi metile, fluoro o metossi e la stereochimica del centro chirale asteriscato con (\*) in (I) è R (Rectus), oppure RS (racemo).

3. Preparato farmaceutico comprendente come sostanza attiva almeno uno dei composti secondo la rivendicazione 1 o un loro sale farmaceuticamente accettabile.

4. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 per l'impiego nella terapia di forme patologiche dell'apparato gastrointestinale quali pancreatiti, coliche biliari, reflusso gastro-esofageo (GERD), sindrome del colon irritabile (IBS), dispepsia non ulcerosa.

5. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 per l'impiego nella terapia delle affezioni

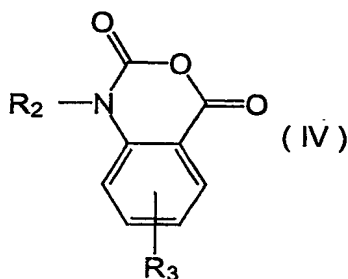
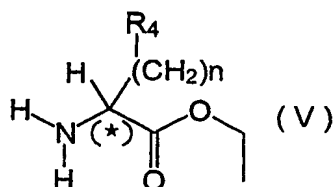
tumorali sostenute dalla CCK ed altri polipeptidi bioattivi ad essa correlati.

6. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 per il trattamento di situazioni patologiche del SNC legati a scompensi dei livelli fisiologici neuronali della CCK o di altri polipeptidi bioattivi ad essa correlati, quali ad esempio ansia, attacchi di panico, psicosi, depressione, anoressia etc. o ad altra cause correlate al meccanismo d'azione dei composti secondo la rivendicazione 1.

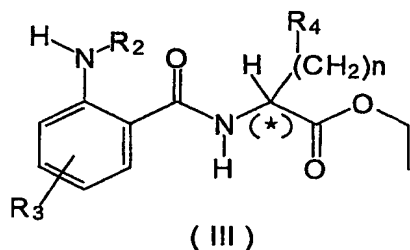
7. Preparato farmaceutico secondo la rivendicazione 3 comprendente inoltre ingredienti inattivi farmaceuticamente accettabili, scelti dal gruppo che consiste di veicoli, leganti, aromatizzanti, disgreganti, conservanti, umettanti e miscele di questi, o ingredienti che facilitano l'assorbimento transdermico o che permettano il rilascio controllato nel tempo della sostanza attiva.

8. Procedimento per la preparazione di un derivato di formula generale (I) in cui  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  ed  $n$  hanno il significato riportato nella rivendicazione 1 ed in cui i sostituenti sul centro chirale asteriscato con (\*) hanno la configurazione R, S, oppure (R,S) (racemo), che comprende le operazioni di:

a) Far reagire in rapporto stechiometrico il cloridrato dell'estere etilico degli aminoacidi di formula (V) in cui n ed R<sub>4</sub> hanno il significato sopra indicato ed aventi il centro chirale nella configurazione desiderata, con l'anidride isatoica di formula (IV)

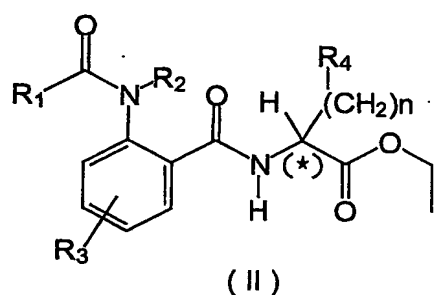


opportunamente sostituita con R<sub>2</sub> ed R<sub>3</sub>, in cui R<sub>2</sub> ed R<sub>3</sub> hanno il significato sopra riportato, in presenza di una amina terziaria quale ad esempio trietilamina, in un solvente inerte e ad una temperatura compresa tra i +10° e la temperatura di ebollizione del solvente, per dare gli N-antranoil-aminoacidi etilesteri di formula (III).

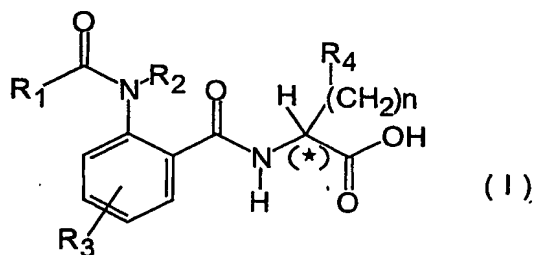


b) Far reagire i derivati antranilici di formula (III), in cui n, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> ed R<sub>4</sub> hanno il significato

riportato sopra, con una quantità equivalente di un cloruro acilico di formula  $R_1\text{-COCl}$ , in cui  $R_1$  ha il significato sopra riportato, preferibilmente in piridina ed ad una temperatura compresa tra i  $0^\circ$  ed i  $+30^\circ$  e recuperare dalla miscela di reazione gli acil-derivati di formula (II).



c). Idrolizzare gli esteri di formula (II), in cui  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato riportato sopra, in un solvente inerte (quale ad esempio tetraidrofurano), con una soluzione acquosa di una base inorganica forte (come l'idrossido di litio), per un periodo di tempo compreso tra 4 e 48 ore. Dopo evaporazione del solvente ed acidificazione, recuperare dalla massa di reazione i derivati dell'acido antranilico di formula (I)



in cui  $n$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  ed  $R_4$  hanno il significato sopra riportato e con il centro chirale nella configurazione desiderata. I composti finali di formula (I) vengono isolati come tali oppure come sali farmaceuticamente accettabili e purificati con metodi convenzionali.

PER INCARICO

*Angelo Gerbino*  
ANGELO GERBINO  
(Iscri. No. 488BM)

JACOBACCI & PARTNERS SpA



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**